บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.tci-thaijo.org/index.php/jmvm/

ความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงวันดูดเลือดสัมพันธ์กับความชุกของเชื้อ *Anaplasma marginale* ในฟาร์มโคนม จังหวัดราชบุรี

นันทิยา แซ่เตียว[1,#] โรเจอร์ สตีช[2] และสถาพร จิตตปาลพงศ์[3]

[1]สาขาสัตวศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง, จ.ราชบุรี 70150

[2]ภาควิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์, มหาวิทยาลัยมิสซูรี, โคลัมเบีย, 65211, สหรัฐอเมริกา

[3]คณะเทคนิคสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ, 10900

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงวันดูดเลือดและความชุกของเชื้อ *Anaplasma marginale* ที่พบในแมลงวันดูดเลือดในฟาร์มโคนม จังหวัดราชบุรี โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันดูดเลือดจำนวน 1,419 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนม จังหวัดราชบุรี ประกอบด้วยพื้นที่ในอำเภอโพธาราม (375 ตัวอย่าง) อำเภอบ้านโป่ง (652 ตัวอย่าง) และอำเภอจอมบึง (392 ตัวอย่าง) โดยทำการจำแนกชนิดและตรวจหาการติดเชื้อ *A. marginale* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) จากการศึกษาพบแมลงวันดูดเลือด ประกอบด้วย 2 วงศ์ 3 ชนิด ได้แก่ วงศ์ Muscidae พบ 2 ชนิดคือ ชนิด Stomoxys (*Stomoxys calcitrans*, *S. indicus* และ *S. sitiens*) และชนิด Haematobia และ วงศ์ Tabanidae พบ 1 สกุล คือ ชนิด Tabanus (*Tabanus rubidus* และ *T. striatus*) โดยพบว่าการที่แมลงวันดูดเลือดมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝน และพบมากที่สุดในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม สำหรับการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* พบเชื้อร้อยละ 4.75 (68/1,419) ผลจากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด คือ ชนิดของแมลงวันดูดเลือด ฤดูกาลและปริมาณน้ำฝน ($P<0.05$) ดังนั้น ในการควบคุมปริมาณของแมลงวันดูดเลือด แนะนำให้กำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงวันดูดเลือดบริเวณรอบฟาร์มโคนมก่อนเข้าฤดูฝน และควรเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่มีแมลงวันดูดเลือดเป็นพาหะในพื้นที่

คำสำคัญ: ความชุก แมลงวันดูดเลือด ฟาร์มโคนม อะนาพลาสมา มาร์จินาเล

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2561. 13(2): 171-184.

E-mail address: nsaetiew@gmail.com

Submitted date 2018-09-07 Revised date 2018-12-03 Accepted date 2018-12-11

Biodiversity of Blood Sucking Flies associated with the Prevalence of *Anaplasma marginale* infection in Dairy Farms in Ratchaburi Province

Nantiya Saetiew[1,#], Roger W. Stich[2], and Sathaporn Jittapalapong[3]

[1]Division of Animal Science, Faculty of Science and Tecnology Muban chombueng rajabhat university, Ratchaburi 70150

[2] Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia, USA, Missouri 65211

[3]Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok, 10900

Abstract: The objective of this research was to study the association between the biodiversity of blood sucking flies and prevalence *Anaplasma marginale* infections in dairy cattle in Ratchaburi Province. A total of 1,419 samples of blood sucking flies was collected from dairy farms of Ratchaburi Province, including 375 samples from Photharam District, 652 samples from Ban Pong District, and 392 samples from Jom Bueng District. The flies were classified by taxonomy and *A. marginale* was detected, using Polymerase chain reaction (PCR). The blood sucking flies were characterized into 2 families and 3 genus including Muscidae family: genus Stomoxys *(Stomoxys calcitrans*, *S. indicus*, and *S. sitiens*) and genus Haematobia, and Tabanidae family: genus Tabanus (*Tabanus rubidus* and *T. striatus*). Blood sucking flies were including associated with the amount of rain and they are mostly found during June to August. According to *A. marginale* detection, the percentage of *A. marginale* infection in blood sucking flies 4.75% (68/1,419). Factors influenced the infection of *A. marginale* in blood sucking flies were diversity of blood sucking flies, season, and the amount of rain ($P<0.05$). Therefore, for the control, the breeding habitat of these flies should be modified which is around the dairy farms, before the rain season while the surveillance should be arranged to prevent the epidemic caused by blood sucking flies in the area.

Keywords: Prevalence**,** Blood Sucking Flies, Dairy cattle, *Anaplasma marginale*

[#]Corresponding author

E-mail address: nsaetiew@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(2): 171-184.

บทนำ

แมลงวันดูดเลือด (blood-sucking flies หรือ biting flies) ได้แก่ เหลือบ (deer flies หรือ horse flies) แมลงวันคอกสัตว์ (stable flies) และแมลงวันเขาสัตว์หรือแมลงวันริ้นควาย (horn flies or buffalo flies) เป็นพาหะนำโรค (Insect vector) ที่สำคัญในทางการผลิตปศุสัตว์ รวมทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข จากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในปัจจุบันเป็นสาเหตุหนึ่ง ทำให้แมลงเป็นตัวการในการแพร่ระบาดของโรคหลายชนิด (Baldacchino et al., 2013)

โรคอะนาพลาสโมซิสในโค กระบือ (Bovine Anaplasmosis) เกิดจากเชื้อริคเก็ตเชียชนิด *Anaplasma marginale* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงทำให้เกิดการตายของโค โดยมีเห็บและแมลงดูดเลือดหลายชนิดเป็นพาหะ การถ่ายทอดเชื้อเป็นแบบโดยตรง คือเชื้อผ่านออกพาหะแล้วเข้าสู่ตัวสัตว์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โคที่เป็นโรคพบอาการทั้งแบบรุนแรงและแบบเรื้อรัง ซึ่งจะทำลายเม็ดเลือดแดง ในสัตว์ที่รับเชื้อจะแสดงอาการไข้สูง เยื่อเมือกซีด โลหิตจาง ในสัตว์ที่ตั้งท้องจะเกิดภาวะแท้ง สัตว์ที่ได้รับเชื้อจะให้น้ำนมลดลงซึ่งในโคนมน้ำนมจะลดอย่างชัดเจน สัตว์ป่วยที่มีอายุมากจะตายภายใน 1-4 วัน (OIE, 2012)

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. marginale* ในโค จะใช้การย้อมสีฟิล์มเลือดทำแบบ Thick และ Thin film blood smear แล้วย้อมด้วยสี Giemsa จากนั้นตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัด คือผู้อ่านสไลด์ต้องมีความชำนาญในการแยกรูปร่างของเชื้อ *A. marginale* กับเชื้อชนิดอื่น อีกทั้งวิธีการนี้มีความไวต่ำ (low sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในกรณีปริมาณเชื้อในเลือดต่ำกว่า 10^6/มิลลิลิตร การวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีโอกาสที่จะไม่พบเชื้อ (Gale et al., 1996) ทำให้การตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ในสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคเกิดความผิดพลาดได้ง่าย การตรวจโดยวิธี ELISA (Enzyme-Link Immunosorbent Assay) วิธีนี้อาศัยการจับที่จำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนและถูกนำมาใช้ตรวจหาเชื้อในโค แอนติบอดีที่ใช้ส่วนมากจะเป็นแอนติบอดีชนิดเดี่ยวหรือ Monoclonal Antibody ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจสอบนี้เป็นการค้าแล้ว แต่อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายในการตรวจต่อหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ การใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction - PCR) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* อีกวิธีหนึ่งที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยโรค (Carelli et al., 2007) โดยในปัจจุบันยีนที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ได้แก่ ยีนในกลุ่ม major surface protein (*msp*) ซึ่งยีน *msp4* มีความจำเพาะ และใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. marginale* อย่างแพร่หลาย (de la Fuence et al., 2003, 2004)

โรคอะนาพลาสโมซิสมีรายงานพบในประเทศไทยมานานกว่า 50 ปี ซึ่งจังหวัดราชบุรี เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่การเลี้ยงโคนมที่สำคัญของประเทศไทย โดยลักษณะภูมิประเทศของจังหวัดราชบุรี ประกอบไปด้วย ทิวเขา หุบเขา และ ที่ราบลุ่มแม่น้ำ โดยพื้นที่ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นป่าไม้และภูเขา (ร้อยละ63) ซึ่งมีความหลากหลายของแมลงพาหะนำโรคในพื้นที่ (Muenworn et al., 2010) แต่รายงานการพบโรคยังคงมีอยู่จำนวนน้อย โดยการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจชนิด ความชุก และตรวจหา

เชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนการควบคุมและการป้องกันเพื่อลดจำนวนประชากรของแมลงวันดูดเลือดซึ่งเป็นพาหะนำโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สถานที่ทำการศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

1.1 ฟาร์มโคนมในจังหวัดราชบุรีจำนวน 6 ฟาร์ม โดยแบ่งฟาร์มออกเป็น 3 ขนาด การแบ่งขนาดของฟาร์มใช้ตามประกาศระเบียบมาตรฐานฟาร์มสัตว์ของประเทศไทย พ.ศ. 2542 “ฟาร์มขนาดเล็ก” หมายถึงฟาร์มที่มีจำนวนสัตว์ไม่เกิน 20 ตัว จำนวน 2 ฟาร์ม “ฟาร์มขนาดกลาง” หมายถึงฟาร์มที่มีจำนวนสัตว์อยู่ระหว่าง 21-100 ตัว จำนวน 2 ฟาร์ม และ “ฟาร์มขนาดใหญ่” หมายถึงฟาร์มที่มีจำนวนสัตว์เกินกว่า 100 ตัว จำนวน 2 ฟาร์ม

ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ปี ซึ่งภายใน 1 ปีลักษณะของภูมิอากาศของประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 ฤดูกาล คือ ฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงกลางเดือนกันยายน โดยเดือนที่มีฝนตกมากที่สุดคือ เดือนกันยายน ฤดูแล้งเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม และฤดูร้อน เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม

1.2 การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างแมลงวันดูดเลือดโดยติดตั้งกับดักที่เรียกว่า Nzi trap เก็บตัวอย่างแมลงวันคอกสัตว์ โดยการติดตั้งกับดักที่เรียกว่า Nzi Trap ซึ่งมีขนาดความกว้าง 2 เมตร ความยาว 2 เมตร ความสูงของเสากลาง 1.5 เมตร และความสูงของเสาข้างจากพื้นดิน 6 เซนติเมตร (mihok et al., 2006) (ภาพที่ 1) กับดักจะวางใกล้กับคอกสัตว์ห่างจากขอบรั้วคอกไม่เกิน 1 เมตร ฟาร์มละ 1 กับดัก เริ่มตั้ง แต่เดือนธันวาคม 2559 ถึงเดือนสิงหาคม 2560 โดยในทุกๆ เดือนๆ ละ 7 วัน ติดต่อกันจะทำการเก็บแมลงโดยติดตั้งกับดัก โดยจะติดตั้งกับดักตั้งแต่เวลา 6.00 ถึง 18.00 นาฬิกา

1.3 การจำแนกชนิดของแมลงวันคอก นำตัวอย่างแมลงวันดูดเลือดที่เก็บได้จากกับดัก มาแยกออกจากแมลงอื่น ๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) เพื่อจัดจำแนกชนิดและนับจำนวน การจำแนก ชนิดของแมลงถึงระดับวงศ์ สกุล และชนิด โดยใช้ key ของ Zumpt (1973) และ Tumrasvin and Shinonaga (1978) ภายหลังการจำแนกตัวอย่างแล้ว เก็บตัวอย่างใน 95% เอทานอล และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปศึกษา

ภาพที่ 1 กับดักแบบ NZI

1.4 การตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด

1.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างแมลงภายหลังจากการจำแนกชนิดแล้ว บดใน CTAB buffer ปริมาณ 0.25 มิลลิลิตรต่อแมลง 1 ตัว เมื่อบดจนละเอียดเติม CTAB buffer ปริมาณ 0.75 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ระหว่างนั้นนำออกมาเขย่าทุก 3 นาที

1.4.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) เติม 500 ไมโครลิตร ของ lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl และ Na_2EDTA pH 8.2) แยกสกัด DNA โดยใช้ Phenol/Chloroform ในปริมาตร 1:1 ผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วน ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนสกัดอีกครั้งด้วย Chloroform ในปริมาตร 1:1 ผสมสารทั้งสองชั้นด้วยการเขย่าเบาๆ และนำไปปั่นเพื่อแยกชั้นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บสารละลายส่วนบนเพื่อนำมาตกตะกอน DNA โดยใช้ absolute ethanol ที่เย็นแล้วล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทิ้งไว้ให้แห้ง และละลาย DNA ในสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl , pH 7.4, 1 M EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4.3 การตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด การเพิ่มจำนวนยีน *msp4* โดยใช้ primers คือ MSP43 (5'-CCGGATCCTTAGCTG AACAGGAATCTTGC-3') และ MSP45 (5'-GGG AGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3') (de la Fuente et al., 2005) สภาวะและองค์ประกอบสำหรับการทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวน ยีน *msp4* ใช้ตามวิธีของ de la Fuente et al. (2005) ผลผลิตของพีซีอาร์ จะมีขนาดประมาณ 849 เบสแพร์ และนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis (1% agarose gel) ทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของ Macrogen sequencing service (Seoul, Korea) และนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อเปรียบเทียบค่าความเหมือนของเชื้อ (% identity)

2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความชุกของชนิดแมลงวันดูดเลือด (Prevalence rate) คำนวณเป็นร้อยละ และ การติดเชื้อ *A. marginale* คำนวณจากอัตราส่วนของตัวอย่างที่ positive ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ กับจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยใช้ Chi-square tests วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ทั้งนี้ $p<0.05$ แสดงถึงการมีนัยสำคัญทางสถิติ และเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อในแมลงวันดูดเลือดโดยใช้ odds ratio ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ปัจจัยเสี่ยงที่ศึกษาได้แก่ พื้นที่ ชนิดของแมลงวันดูดเลือด ระบบการเลี้ยง ขนาดของฟาร์ม ฤดูกาลและปริมาณน้ำฝน

ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาในฟาร์มโคนมในจังหวัดราชบุรี ซึ่งในพื้นที่มีจำนวนเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ 28,509 ครัวเรือน โดยมีอาชีพในการเลี้ยงโคนม 2,175 ครัวเรือนคิดเป็นร้อยละ 7.63 โดยระบบการเลี้ยงโคนมในพื้นที่จังหวัดราชบุรีพบการเลี้ยง 2 รูปแบบคือ การเลี้ยงแบบยืนโรง และการเลี้ยงแบบยืนโรงร่วมกับการเลี้ยงปล่อย

จากการศึกษาการกระจายตัวและความหลากหลายของแมลงวันดูดเลือดในจังหวัดราชบุรี พบว่าแมลงวันดูดเลือดที่สำรวจจำนวน 1,491 ตัว พบแมลงวันใน 2 วงศ์ 3 สกุล (วงศ์ Tabanidae และ Muscidae) ได้แก่ 1) วงศ์ Muscidae พบ 2 สกุลคือ สกุล Stomoxys (*Stomoxys calcitrans*, *Stomoxys indicus* และ *Stomoxys sitiens*) และสกุล Haematobia 2) วงศ์ Tabanidae พบ 1 สกุล

คือ สกุล Tabanus (*Tabanus rubidus* และ *Tabanus striatus*) แสดงดังตารางที่ 1

ภาพที่ 2 *Stomoxys calcitrans* (6-8 mm)

โดยสกุล Stomoxys พบ 3 ชนิดคือ *Stomoxys calcitrans* จำนวน 387 ตัว คิดเป็นร้อยละ 27.27 *Stomoxys indicus* จำนวน 273 ตัว คิดเป็นร้อยละ 19.24 และ *S. sitiens* จำนวน 489 ตัว คิดเป็นร้อยละ 34.46 และสกุล Haematobia พบจำนวน 130 ตัว คิดเป็นร้อยละ 9.16 จากการศึกษาชนิดและจำนวนของแมลงวันดูดเลือดในจังหวัดราชบุรี พบความสัมพันธ์ของชนิด และจำนวนของแมลงวันดูดเลือด (χ^2=234.75, P< 0.01) โดยวงศ์ Muscidae พบแมลงวันดูดเลือดสกุล Stomoxys ทุกฤดูกาล (เดือนธันวาคม 2559 ถึงเดือนสิงหาคม 2560) สกุล Haematobia พบในเดือนธันวาคม 2559 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2560 และเดือนเมษายนถึงสิงหาคม 2560 สำหรับวงศ์ Tabanidae พบ 1 สกุล คือ สกุล Tabanus พบ 2 ชนิด คือ *Tabanus rubidus* จำนวน 26 ตัว คิดเป็นร้อยละ 1.83 และ *T. striatus* จำนวน 114 ตัว คิดเป็นร้อยละ 8.03 โดยสกุล Tabanus พบว่า *T.striatus* กระจายในทุกเดือนที่ทำการสำรวจ คือ ธันวาคม 2559 ถึงสิงหาคม 2560 ส่วน *T. rubidus* พบเฉพาะในเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม 2560

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด กับปัจจัยด้านพื้นที่ระบบการเลี้ยง ชนิดของแมลงวันดูดเลือด ขนาดฟาร์มโคนม ปริมาณน้ำฝน และฤดูกาล พบว่าพื้นที่การเลี้ยงโคนม ระบบการเลี้ยงและ ขนาดฟาร์มไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด แต่การติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดแสดงความสัมพันธ์กับปัจจัยในด้านชนิดของแมลงวันดูดเลือด (χ^2=39.49, P= 0.01)

ปริมาณน้ำฝน (χ^2=58.66, P=0.01) และฤดูกาล (χ^2=6.35, P=0.04) โดยการติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดกับปัจจัยด้านชนิดของแมลงวันดูดเลือด พบว่าชนิดของแมลงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) โดยการพบแมลงชนิด *S. calcitrans* (Odds ratio =23.86, 95% CI = 1.45-392.49, *P*=0.02) *T. rubidus* (Odds ratio =26.63, 95% CI = 1.24-571, *P*=0.03) และ *T. rubidus* (Odds ratio =29.00, 95% CI = 1.69-497.94, *P*=0.02) แสดงถึงปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *A. marginale* เมื่อเทียบกับแมลงวันดูดเลือดชนิดอื่น ๆ ที่พบในจังหวัดราชบุรี

สำหรับปัจจัยด้านฤดูกาล พบว่า ฤดูฝนพบความชุกของการติดเชื้อในแมลงวันดูดเลือดสูงสุด โดยมีอัตราการติดเชื้อ *A. marginale* ร้อยละ 6.26 (40/639) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) โดยการติดเชื้อ *A. marginale* ในฤดูฝน มีปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *A. marginale* เท่ากับ 2.42 เมื่อเทียบกับผลการติดเชื้อ *A. marginale* ในฤดูหนาว และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำฝน และการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* ที่ตรวจ

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนของแมลงวันดูดเลือดซึ่งเก็บจากกับดัก Nzi ในฟาร์มโคนมจำนวน 6 ฟาร์ม ในจังหวัดราชบุรี

วงศ์	สกุล/ชนิด (ตัว)	ฤดูหนาว (ตัว)			ฤดูร้อน (ตัว)			ฤดูฝน (ตัว)			รวม
		ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	
Muscidae	Genus *Stomoxys*										
	- *S. calcitrans*	14	18	24	27	27	112	88	41	36	387 (27.27)
	- *S. indicus*	24	19	27	32	31	22	34	45	39	273 (19.24)
	- *S. sitiens*	56	36	21	43	32	83	79	93	46	489 (34.46)
	Genus Haematobia	2	12	10	0	12	42	23	20	9	130 (9.16)
	รวม (ตัว)	96	85	82	102	102	259	224	199	130	1,279
	(%)	(7.51)	(6.65)	(6.41)	(7.97)	(7.97)	(20.25)	(17.51)	(15.56)	(10.16)	(90.13)
Tabanidae	Genus *Tabanus*										
	- *T. rubidus*	0	0	0	0	0	1	5	6	14	26 (1.83)
	- *T. striatus*	12	8	15	10	2	7	23	32	5	114 (8.03)
	รวม (ตัว)	12	8	15	10	2	8	28	38	19	140 (9.87)
	(%)	(8.57)	(5.71)	(10.71)	(7.14)	(1.43)	(5.71)	(20.00)	(27.14)	(13.57)	
	รวมทั้งหมด (ตัว)	108	93	97	112	104	267	252	237	149	1,419
	(%)	(7.61)	(6.55)	(6.84)	(7.89)	(7.33)	(18.82)	(17.76)	(16.70)	(10.50)	
χ^2 =234.75, df =40, P< 0.01											

พบจากแมลงวันดูดเลือด พบว่า ปริมาณน้ำฝนมีความสัมพันธ์กับจำนวนแมลงวันดูดเลือดโดยจำนวนแมลงวันดูดเลือด มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำฝน (χ^2=58.66, P= 0.01) แต่จำนวนการติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดพบมากที่สุดเมื่อมีปริมาณน้ำฝน 35.1-90 มิลลิเมตร โดยช่วงปริมาณน้ำฝนดังกล่าวแสดงปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *A. marginale* 5.77 เท่า เมื่อเทียบกับช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

ความชุกของเชื้อ Anaplasma marginale

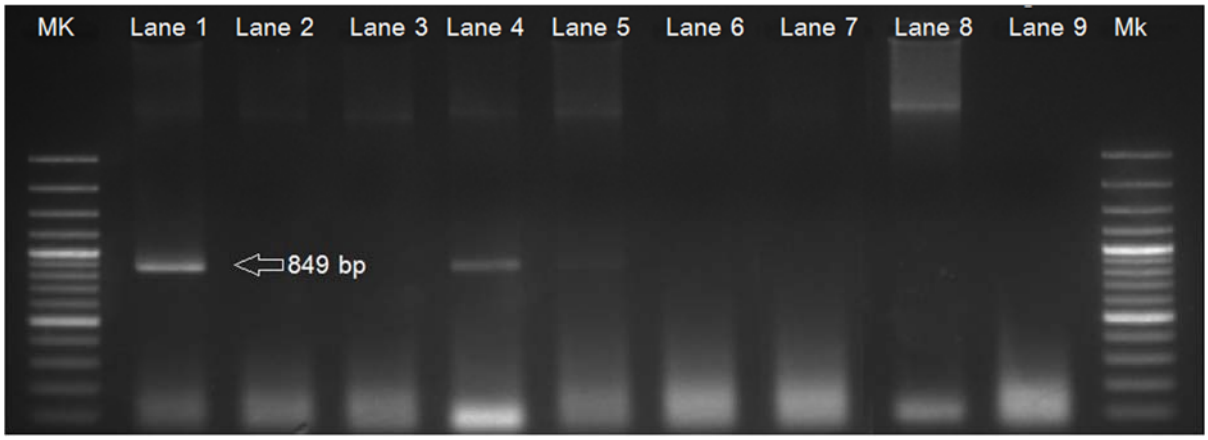
การตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดในจังหวัดราชบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลาร์ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,419 ตัวอย่าง ตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อ *A. marginale* ร้อยละ 4.79 (68/1,419) ในแมลงวันดูดเลือด ในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับการจำแนกชนิด *Anaplasma* spp. ด้วยเทคนิค PCR โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *msp4* พบว่าคู่ไพรเมอร์และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *Anaplasma* spp. เป้าหมายได้ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 849 bp และเมื่อนำ PCR product ดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Sequence analysis (Biodesign) เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ ที่มีในฐานข้อมูล Genbank โดยโปรแกรม BLAST และ alignment ClustalW พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีนัสกับ *A. marginale* (accession number: AY 127073) ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับร้อยละ 99 สำหรับการติดเชื้อ *A. marginale* ในจังหวัดราชบุรี

ตารางที่ 2 ผลของความชุกของการติดเชื้อ *A. marginale* ที่ตรวจผลในแมลงวันดูดเลือด (Musidae & Tabanidae) จังหวัดราชบุรี

ปัจจัย	จำนวน (ตัว)	ตัวอย่างที่ตรวจพบ *A. marginale* (ตัว, %)	χ^2	Df	*P*-value
พื้นที่					
อำเภอจอมบึง	392	17 (6.1)			
อำเภอโพธาราม	375	16 (4.3)			
อำเภอบ้านโป่ง	652	35 (5.4)	1.32	2	0.517
ระบบการเลี้ยง					
ยืนโรง	1,027	51 (4.9)			
ยืนโรงร่วมกับการเลี้ยงปล่อย	392	17(4.4)	0.28	1	0.594
ชนิด					
Stomoxys calcitrans	387	32 (8.3)			
Stomoxys indicus	273	11 (4.2)			
Stomoxys sitiens	489	12 (2.5)			
Haematobia spp.	130	0 (0.0)			
Tabanus rubidus	26	2 (8.3)			
Tabanus striatus	114	11 (8.8)	39.49	5	0.001**
ขนาดฟาร์ม					
ขนาดเล็ก (1-20 ตัว)	379	16 (4.2)			
ขนาดกลาง (21-100 ตัว)	388	17 (4.4)			
ขนาดใหญ่ (มากกว่า 100 ตัว	652	35 (5.4)	1.34	2	0.51
ฤดูกาล					
หนาว (ธ.ค.-ก.พ.)	298	8 (2.7)			
ร้อน (มี.ค.-พ.ค.)	482	20 (4.15)			
ฝน (มิ.ย.-ส.ค.)	639	40 (6.26)	6.35	2	0.04*
ปริมาณน้ำฝน					
ฝนเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 มิลลิเมตร)	284	5 (1.76)			
ฝนปานกลาง (10.1-35 มิลลิเมตร)	528	10 (1.89)			
ฝนหนัก (35.1-90 มิลลิเมตร)	331	31 (9.37)			
ฝนหนักมาก (ตั้งแต่ 90.1 มิลลิเมตรขึ้นไป)	276	22(7.97)	58.66	3	0.01*
รวม	**1,419**				

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงและการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* ที่ตรวจพบจากแมลงวันดูดเลือดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ปัจจัยเสี่ยง	Odd ratio	95% CI	*P*-value
ชนิด			
Stomoxys calcitrans	23.86	1.45-392-49	0.02
Stomoxys indicus	11.43	0.66-195.50	0.09
Stomoxys sitiens	6.83	0.40-116.17	0.18
Haematobia spp.	1		
Tabanus rubidus	26.63	1.24-571.0	0.03
Tabanus striatus	29	1.69-497.94	0.02
ฤดู			
1. หนาว (ธ.ค.-ก.พ.)	1		
2. ร้อน (มี.ค.-พ.ค.)	1.56	0.68-3.61	0.28
3. ฝน (มิ.ย.-ส.ค.)	2.42	1.12-5.23	0.02
ปริมาณน้ำฝน			
1. ฝนเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 มิลลิเมตร)	1		
2. ฝนปานกลาง (10.1-35 มิลลิเมตร)	1.07	0.36-3.18	0.89
3. ฝนหนัก (35.1-90 มิลลิเมตร)	5.77	2.21-15.03	0.001
4. ฝนหนักมาก (ตั้งแต่ 90.1 มิลลิเมตรขึ้นไป)	3.72	1.45-9.54	0.006



ภาพที่ 3 การเพิ่มปริมาณของยีน *msp4* โดยใช้ไพร์เมอร์ msp45/msp43 ; Lane Mk = 100 bp DNA Ladder Marker, Lane 1 = Positive control, Lane 9 = Negative control, Lane 4 ตัวอย่างที่ติดเชื้อ *A. marginale* ขนาด 849 bp

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจแมลงวันดูดเลือดในอันดับ Diptera โดยใช้กับดัก Nzi ในฟาร์มโคนมจังหวัดราชบุรี จำนวน 6 ฟาร์ม ตั้งแต่ ธันวาคม 2559 ถึง สิงหาคม 2560 พบแมลงวันดูดเลือดจำนวน 1,419 ตัว โดยความชุกของแมลงวันคอก (*Stomoxys* spp.) เป็นแมลงวันดูดเลือดที่มีความชุกสูงที่สุดโดยพบร้อยละ 90.13 และพบตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โดยพบว่ามีจำนวนเพิ่มมากในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง สิงหาคม โดยความหลากหลายของชนิดแมลงวันดูดเลือดในพื้นที่ จังหวัดราชบุรี พบแมลงวันดูดเลือดใน 2 วงศ์ 3 สกุล ได้แก่ 1) วงศ์ Muscidae พบ 2 สกุล คือ สกุล Stomoxys (*S. calcitrans*, *S. indicus* และ *S. sitiens*) และสกุล Haematobia 2) วงศ์ Tabanidae พบ 1 สกุล คือ สกุล Tabanus (*T. rubidus* และ *T. striatus*)

การตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดในจังหวัดราชบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,419 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบเชื้อ *A. marginale* ร้อยละ 4.79 (68/1,419) สำหรับการหาความสัมพันธ์ด้านปัจจัยต่าง ๆ กับการพบเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด คือ พื้นที่ระบบการเลี้ยง ชนิดของแมลงวันดูดเลือด ขนาดฟาร์ม ปริมาณน้ำฝนและฤดูกาล ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ *A. marginale* มีความสัมพันธ์กับชนิดของแมลงวันดูดเลือด ฤดูกาลและปริมาณน้ำฝน

สำหรับแมลงวันคอกสัตว์ในสกุล *Stomoxys* spp. ในการสำรวจครั้งนี้ในจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยพบ 3 ชนิด คือ *S. calcitrans, S. indicus* และ *S. sitiens* เมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานชนิดของแมลงวันคอกสัตว์ในประเทศไทยทั้งหมดพบว่ามี 6 ชนิด คือ *S. bengalensis, S. calcitrans, S. indicus, S. pulla, S. sitiens* และ *S. uruma* (Tumrasvin and Shinonaga, 1978) และผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบ 5 คือ *S. calcitrans*, *S. sitiens*, *S. indica*, *S. bengalensis* แล *S. uruma* (Kaewmanee et al., 2008) สำหรับในพื้นที่ภาคกลาง การสำรวจชนิดของแมลงวันคอกสัตว์ในสกุล *Stomoxys* spp. ของ Phasuk et al., (2016) และ Masmeatathip et al., (2006) พบ 4 ชนิด คือ *S. calcitrans*, *S. sitiens, S. indica* และ *S. bengalensis* โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *S. calcitrans* (70-99%) และชนิดที่พบน้อยที่สุดคือ *S. bengalensis* (0.01-0.5%) ชนิดที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับการสำรวจครั้งนี้ คือ *S. bengalensis* ซึ่งในการสำรวจครั้งนี้ไม่พบแมลงวันดูดเลือดชนิดดังกล่าว ความชุกชุมของ *Stomoxys* spp. มีความชุกชุมสูงที่สุด 80.97 % และพบตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น สัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Masmeatathip et al., (2006) ที่รายงานว่าแมลงวันคอกสัตว์มีจำนวนมากในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม โดยในการศึกษานี้พบว่าปัจจัยของฤดูกาลและปริมาณน้ำฝนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับจำนวนแมลงวันดูดเลือด เนื่องจากปริมาณน้ำฝนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันดูดเลือด จึงพบการระบาดของแมลงวันดูดเลือดมากในช่วงฤดูฝน Holloway and Phelps (1991) และ Keawrayup et al., (2012) รายงานว่าจำนวนแมลงวันดูดเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณ

น้ำฝน พบว่าแมลงวันดูดเลือดมีมากขึ้นเมื่อมีปริมาณน้ำฝนเพิ่มขึ้น

แมลงวันเขาสัตว์ (*Haematobia* spp.) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีความชุกร้อยละ 9.16 โดยจังหวัดราชบุรีพบการกระจายของ *Haematobia* ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2559 ถึงเดือนสิงหาคม 2560 โดยพบมากที่สุดในเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม ซึ่งผลสอดคล้องการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Lima et al., (2003) และ Maldonado-Siman et al., (2009) รายงานว่าจำนวนของแมลงวันเขาสัตว์ มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณน้ำฝน แต่การศึกษาของ Torres et al., (1996) และ Castro et al., (2008) พบว่าจำนวนแมลงวันเขาสัตว์จะพบสูงสุดในช่วงฤดูร้อนจนถึงต้นฤดูฝนโดยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ

เหลือบ (*Tabanus* spp.) พบ 2 ชนิด คือ *Tabanus striatus* และ *T. rubidus* โดยความชุกเท่ากับร้อยละ 8.03 และ ร้อยละ 1.83 ตามลำดับ พบมากในเดือนพฤษภาคม ถึง สิงหาคม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Ito et al., (1999) ที่พบว่าเหลือบสกุล *Tabanus* ที่พบในจังหวัดปทุมธานีมีมากที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกันเนื่องมาจากช่วงระยะเวลาของปริมาณน้ำฝน และปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น

ความชุกของเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดในจังหวัดราชบุรี โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,419 ตัวอย่างจาก 6 ฟาร์ม ตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อ *A. marginale* ร้อยละ 4.79 (68/1,419) สำหรับการหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยง และการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือด ประกอบด้วย 6 ปัจจัยคือ พื้นที่ ระบบการเลี้ยง ชนิดของแมลงวันดูดเลือด ขนาดของฟาร์มโคนม ปริมาณน้ำฝน และฤดูกาล ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ *A. marginale* มีความสัมพันธ์กับชนิดของแมลงวันดูดเลือด ปริมาณน้ำฝน และฤดูกาล โดยในช่วงฤดูฝนจะมีความจำนวนแมลงวันดูดเลือดเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับฤดูกาลอื่น ๆ ทั้งนี้เป็นผลมาจากปริมาณน้ำฝน เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันดูดเลือด จึงพบการระบาดของแมลงวันดูดเลือดมากในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้แมลงวันดูดเลือดสามารถดูดกินเลือดสัตว์ที่มีเชื้อ *A. marginale* แล้วถึงผ่านไปยังสัตว์ซึ่งปลอดเชื้อได้มากขึ้น (Oliveira et al., 2011, Urdaz-Rodriguez et al., 2009)

สรุป

การติดเชื้อ *A. marginale* ในแมลงวันดูดเลือดในฟาร์มโคนม จังหวัดราชบุรี พบอัตราการติดเชื้อ *A. marginale* ที่สูงในแมลงชนิด *T. striatus, T.rubidus* และ *S. calcitrans* ซึ่งช่วงเดือนพฤษภาคม และสิงหาคม เป็นช่วงเดือนที่พบแมลงวันดูดเลือดชุกชุม และเป็นช่วงเดือนที่มีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายโรค ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการควบคุมและป้องกันโรค นอกจากนี้ควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นในบริเวณใกล้เคียง เพื่อติดตามการระบาดที่อาจพบเชื้อนี้และอาจทำให้เกิดความสูญเสียต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุน

การวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง

เอกสารอ้างอิง

Baldacchino, F., V. Muenworn, M. Desquesnes, F. Desoli, T. Charoenviriyaphap, and G. Duvallet. 2013. Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. Parasite. 20: 26.

Carelli, G., N. Decaro, A. Lorusso, G. Elia, E. Lorusso, and V. Mari. 2007. Detection and quantification of Anaplasma marginale DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Vet Microbiol. 124: 107-114.

Castro, E., A. Gil, J. Piaggio, L. Chifflet, N. A. Farias, M. A. Solari, and R. D. Moon. 2008. Population dynamics of horn fly, Haematobia irritans irritans (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. Vet Parasitol. 151: 286–299.

De la Fuente, J., R. A. Bussche, T. M. Prado, and K. M. Kocan. 2003. Anaplasma marginale msp1a genotype evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. J. Clin. Microbiol. 41: 1609–1616.

De la Fuente, J., L. M. F., Passos, R. A. van den Bussche, M. F. B. Ribeiro, E. J. Facury-Filho, and K. M. Kocan. 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of Anaplasma marginale isolates from Minas Gerais, Brazil. Vet. Parasitol. 121: 307–316.

De la Fuente, J., R. B. Massung, S. J. Wong, F. K. Chu, M. L. Lutz, F. D. Meli, A. Loewenich, A. Grzeszczuk, S. Torina, A. J. Caracappa, V. Mangold, S. Naranjo, S. Stuen. and K. M. Kocan. 2005. Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma marginale strains. J. Clin. Microbiol. 43: 1309–1317.

Gale, K. R., C. M. Dimmock, M. Gartside, and G. Leatch. 1996. Anaplasma marginale: detection of carrier cattle by PCR. Int. J. Parasitol. 26: 1103–1109.

Holloway, M. T. P. and R. J. Phelps. 1991. The responses of Stomoxys spp. (Diptera: Muscidae) to traps and artificial host odours in the field. Bull. Entomol. Res. 81: 51-55.

Ito, Y., S. Boonchit, N. Sarataphan, and D. Tuntasuvan. 1999. Species composition and seasonal abundance of horse flies (Diptera: Tabanidae) on a cattle farm in central Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 50: 17-28.

Kaewmanee, C., Y. Hanboonsong, and T. Jamjanya. 2008 .Survey on Species of Stable Flies (Stomoxys spp.) (Diptera: Muscidae) and Fly-repelling Behaviors of Beef Cattle. Proceeding of the 9th KKU Veterinary

Annual. Conference. Thailand, 11-12 June 2008: 179-183.

Keawrayup, S., G. Duvallet, S. Sukonthabhirom, and T. Chareonviriyaphap. 2012. Diversity of Stomoxys spp. (DIPTERA: MUSCIDAE) and Diurnal Variations of Activity of Stomoxys indicus and S. calcitrans a Farm, in Wang Nam Khiao District, Nakhon Ratchasima Province, Thialand. Parasite. 19: 259-265.

Lima, L. G. F., S. H. V. Perri, and A. P. Prado. 2003. Variation in population density of horn flies (Haematobia irritans irritans) (L.) (Diptera: Muscidae) in Nellore cattle (Bos indicus). Vet. Parasitol. 117:309-314.

Maldonado-Siman, E., P. A. Martinez-Hernandez, H. Sumano-Lopez, C. Cruz-Vazquez, R. L. Rodriguez de, and M. A. Alonso-Diaz. 2009. Population fluctuation of horn fly (Haematobia irritans irritans) in an organic dairy farm. J. Anim. Vet. Adv. 8: 1292-1297.

Masmeatathip, R., C. Ketavan, and G. Duvallet. 2006. Morphological studies of Stomoxys spp. (Diptera: Muscidae) in central Thailand. KU Journal: Natural Science. 40: 872-881.

Mihok, S., D. A. Carlson, E. S. Krafsur, and L. D. Foil. 2006. Performance of the Nzi and other traps for biting flies in North America. Bull Entomol. Res. 96(4): 387-97.

Muenworn, V., G. Duvallet, K. Thainchum, S. Tuntakom, S. Tanasilchayakul, A. Prabaripai, P. Akratanakul, S. Sukonthabhirom, and T. Chareonviriyaphap. 2010. Geographic Distribution of Stomoxyine Flies (Diptera: Muscidae) and Diurnal Activity of Stomoxys calcitrans in Thailand. J. Med. Entomol. 47: 791-797.

OIE. 2012. Bovine Anaplasmosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th Edition. Office International des Epizooties, Paris, Chapter 2.4.1.

Oliveira, J. B., J. Montoya, J. J. Romero, A. Urbina, N. Soto-Barrientos, E. S. P. Melo, C. A. N. Ramos, and F. R. Arauj. 2011. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. Vet. Parasitol. 177: 359–365.

Phasuk, J., A. Prabaripai, and T. Chareonviriyaphap. 2016. A Comparison of Attractants for Sampling Stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae) on Dairy Farms in Saraburi Province, Thailand. J Econ. Entomol. 109(2): 942-946.

Torres, P. R., A. C. Cicchino, and A. H. Abrahamovich. 1996. Influence of abiotic factors on horn fly (Haematobia irritans irritans, L. 1758) (Diptera: Muscidae) abundance and the role of ative grass as a resting site in N.M. Santa

Fe province (Argentina). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 5: 15-22.

Tumrasvin, W. and S. Shinonaga. 1978. Studies on medically important flies in Thailand on 32 species belonging to the subfamilies muscinae and stomoxyinae including the taxonomic keys (Diptera: Muscidae). Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 25: 201-227.

Urdaz-Rodríguez, J. H., G. T. Fosgate, A. R. Alleman, D. O. Rae, G. A. Donovan, and P. Melendez. 2009. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for Anaplasma marginale in commercial dairy farms of Puerto Rico. Trop Anim Health Prod. 41: 1439–1448.

Zumpt, F. 1973. The Stomoxyinae biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.